

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

2000-2  
2000-2

優先権主張  
(1975年9月4日米国出願第610501号)

特許願 (特許法第58条各款ただし書  
の規定による特許出願)

(4,000円)

昭和51年9月5日

特許審査官 片山石造 殿

1. 発明の名称 ウィルスの検定

2. 特許請求の範囲に記載された発明の数 3

3. 発明者

アメリカ合衆国、ベンシルヴニア州 19038.  
住所 (居所) グレンサイド、レイヴアーロウツク ロード  
520  
氏名 ロイ エー. マクロウイツツ (外2名)

4. 特許出願人

アメリカ合衆国、ニュージャージイ、コーウエイ  
住所 イースト リンカーン アヴェニュ 126  
メルク エンド カムニー インコーポレーテッド  
代表者 ジェームス エフ. ノートン

氏名 国籍 アメリカ合衆国

5. 代理人

郵便番号 100  
東京都千代田区丸の内3の3・富士ビル510号室  
代理社 岡 部 正 夫 (外2名)  
(6444)

6.添付書類の目録

(1) 明細書 1通  
(2) 願書副本 1通  
図面 1通

51 105063

明細書

1. 発明の名称

ウィルスの検定

2. 特許請求の範囲

1. ウィルスにより感染され、タンパク染色法で染色されている細胞培養を含有する細胞培養平板中細胞病害効果の決定法において、染色された細胞培養平板を光源に曝露し、光学的拡大なしに細胞病害効果を決定することを特徴とする方法。

2. タンパク染色法がカルボールフクシン染色法である特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 細胞培養を染色するのに十分な時間細胞培養板をタンパク染料と接触させ、次で過剰の染料を除去することによつて細胞培養を染色する特許請求の範囲第1項記載の方法。

4. 次の工程

a. ウィルス試料を自動的に吸取し；

⑯ 日本国特許庁

公開特許公報

⑪特開昭 52-31825

⑬公開日 昭52.(1977) 3.10

⑯特願昭 51-105063

⑭出願日 昭51.(1976) 9.3

審査請求 未請求 (全7頁)

序内整理番号

7043 44  
6904 49  
7421 49

⑮日本分類

30 D3  
113 E6  
36(2)B5

⑯Int.CI<sup>2</sup>  
C12K 1/00  
G01N 33/16

- b. 細胞懸濁液を自動的に送り；  
c. 細胞培養の培養の間に同時に感染および細胞シートの形成を行ない；そして  
d. 染色し、光学的拡大なしに細胞病害効果を決定する；  
よりなることを特徴とするウィルス検定法。  
5. ウィルスが風疹である特許請求の範囲第1項記載の方法。  
6. ウィルスがおたふくかぜである特許請求の範囲第1項記載の方法。  
7. ウィルスが風疹である特許請求の範囲第1項記載の方法。  
8. ウィルスがヘルペスである特許請求の範囲第1項記載の方法。  
9. 次の工程  
a. 血清試料を自動的に吸引し；  
b. 攻撃ウィルスを自動的に添加し；  
c. 血清／ウィルス混合物をあらかじめ培養し；  
d. 細胞懸濁液を自動的に送り；

- c. 組織培養の培養の間に同時に感染および細胞シートの生成を行ない；そして
- ① 染色し、光学的拡大なしに細胞病害効果を決定する；
- よりなることを特徴とする血清の抗体含量の測定法。

### 3. 発明の詳細な説明

本発明は、ウイルス感染性および血清中和抗体含量の半自動的検定に関する。

- 10 ウイルス検定においては、好適には電気一級板的に調製されたウイルス標本の希釈物を、好適にはミクロタイター平版の凹みに自動的にピペットで入れられている適当な組織培養発育細胞懸濁液の懸濁液と混和する。適当な条件下平版中細胞の培養に次いで、平版から液を排出させ、タンパク染色法で細胞を染色し、次に光学的拡大なしに観取る。

血清中和抗体含量検定においては、検定される血清試料を好適には電気一級板的に改移

- 15 ワイルスと混和する。好適にはミクロタイタ。

ー平版の凹みに自動的にピペットで入れられている適当な組織培養発育細胞懸濁液に、あらかじめ培養された血清／ウイルス混合物を添加する。適当な条件下ミクロタイター平版中細胞の培養に次いで、平版から液を排出させ、タンパク染色法で細胞を染色し、次に光学的拡大なしに観取る。

本発明のウイルス検定は任意のウイルスに適用可能である。ヒトに影響を与えるウイルス並びに動物に影響を与えるウイルスを使用することができる。表示のために（それにより検定されることはない）、本発明のウイルス検定において使用することができるウイルスの例には、風疹、麻疹、おたふくかぜ、ヘルペス、ポリオ、水痘およびマレツク病がある。

#### 1. ウィルス検定

##### A. 検定平版の調製

照通常組織培養平版、転移平版およびふたを包みから取り出し、組織培養平版中所定の場所

- 1 に転移平版と組立て、両者をふたで覆う。平版に、使用される細胞、検定が開始される日付および個々の固定番号の印をふたおよび組織培養平版上に共につける。各試料に対して検定シートを準備する。

##### B. 試料の調製

凍結試料およびハウス・レフアランス・スタンダードの部分標本を、冷水道水で部分的に光とした浴に入れることによって迅速に解凍する。試料は使用直前に解凍し、検定のために取出すまで冷水浴中に置く。

凍結乾燥試料は、所要量の希釈剤を添加することによって還元し、検定のために取出すまで冷水浴中に置く。

##### C. ピペットの調製

延い捨てプラスチック製ため(reservoir)を自動ピッパーの基部の所定の位置に入れ、ユニット中、所定の位置にピッティング・ヘッドを部分的に入れ、その後ピッティング・ヘッドの最上部にゴムの真空漏膜を

置く。次に隔膜で覆つたピッティング・ヘッドを最終位置に動かし、所定の場所に止め、次に無菌100ml空量ピペットを使用して希釈用培地約70mlをためにピペットで入れ、所要に応じてために再充填する。

##### D. 希釈器の調製

延い捨てプラスチック製ため約3/8インチの深さ(ミクロ希釈器の尖端の全浸漬に対し十分)まで無菌蒸溜水を充たす。

ミクロ希釈器の組合せを希釈器から取出し、水に短時間浸漬し、吸収紙にくつつけ、次に各ミクロ希釈器をブンゼンバーナーの焰中で十分焼く。次に加熱したミクロ希釈器を再び水に没し、吸収紙にくつつけ、希釈器中に再置する。

平板毎にミクロ希釈器の組合せを取り出し、吸収紙にくつけて装置ウイルス懸濁液を涂いた後、次にホリンスに浸漬し次に吸取る(更に2回浸漬と吸取のサイクルをくり返す)。次三の平版毎にミクロ希釈器の組合せを取

出し、吸収紙にくつつけ、水に浸漬し、吸引り、上述したとおり培養で焼き、吸引し、吸引る。この同じ操作を、その日の検定の終りに使用する。

#### E. 試料の力価測定

- 転移平板を組成培養平板、転移平板およびふたの組合せから取り出し、転移平板ホルダーに入れれる（ふたは、組成培養平板の最上部に置き換える）。転移平板ホルダーを自動ビベッター中に置き、希釈剤 0.075 ml (0.025 ml の滴、3回) を、典型的には96孔の凹みである凹みの各々に添加する。次に転移平板ホルダーをビベッターから取出す。試験される試料の1滴 (0.025 ml) を、転移平板の列 A 中の 1, 2 缶の凹みの各々に、無菌ビペットを使用して注意して添加する。各試料に対して新しいビペットを使用する。次に転移平板ホルダーを自動希釈器中に置き、7回の 1 : 4 連続希釈（希釈当り 0.6 log<sub>10</sub>）を行う。次に転移平板を転移平板ホルダーから取出す。

試料およびレファレンス・スタンダードをすべて上のとおりに希釈したとき、次のとおり細胞懸濁液を添加する：転移平板を組立てユニットから取り出し、転移平板ホルダーに入れ、ふたで覆う。このユニットの組成培養平板を自動ビベッター中に置く（この直前に、希釈剤を含有する使い捨てためを担当り約 160,000 ~ 約 260,000 個、好適には約 200,000 缶の細胞懸濁液を含有する使い捨てたもので置換する。ビベッターを数回ためにわたって、また空にしてユニットをフラッシュする）。組成培養平板中の凹みの各々に或る量、0.075 ml の細胞懸濁液を添加する (0.025 ml の滴、3回)。

組成培養平板をビベッターから取出し、転

- 移平板をそれに入れ、次に引き上げて転移平板中のウイルス希釈物の組成培養平板中の細胞懸濁液への転移を行なわせる。転移平板を放棄し（オートクレーブ処理するため）、ふたを組成培養平板上に注意して合わせる。他の平板を同様に処理し、互に横み重ね、次に必要な培養温度、典型的には約 30°C ~ 39°C の培養器にウイルスに対する至適の培養時間の間入れる。

- 検定のウイルスに対する至適の培養期間の終りに、平板を培養器から取出す。内容物は、手首をす早くぬかし凹みを下に向けることによつて大きなパンに排出させる。次に、ためて予めタンパク染料、例えばカルボールフクシンが充たされている自動ビベッター中に平板を置く。

カルボールフクシン染料は、液厚形態で使用し、染色の後洗浄工程を行なつてよく、或いは染色の後洗浄工程なしに希釈形態で使用してよい。次に各凹みに染料 0.075 ml を添

加する (0.025 ml の滴、3回)。0.5 分間またはそれ以上の後、染料を平板から排出させる（上述したとおり）。平板を水道水の深皿に浸漬して過剰の染料を洗い出し、前とおり排出させる（比較的希薄な染料の使用によつて洗浄をなくすことができる）。平板を紙タオルで乾燥し、そのふたで覆う。

#### F. 読取検定

平板は、光源に曝露することにより光学的拡大なしに顕微鏡で読取られる。便利な方法は、螢光箱に平板を置くことである。CPE (細胞病害効果 (cytopathic effect)) を示す凹みは、染色を示さない区域によつて容易に認められる。感染しない凹みは均一な赤色の基質を有している。検定シート上感染した凹みは陽性 (+) と評点し、感染しない凹みは陰性 (-) と評価する。

試料の力価を計算するために、計算シートを使用して検定平板の各系に対して感染および非感染凹みを統計する。このシートに示さ

中所定の位置にピペットイング・ヘッドを部分的に入れ、その後ピペットイング・ヘッドの最上部にゴムの真空吸盤を置く。次に轉換で覆つたピペットイング・ヘッドを最終位置に動かし、所定の場所に止める。次に無菌100ml容量ピペットを使用して半胱用培地約70mlをためにピペットで入れ、所要に応じてために再充填する。

#### D. 希沢器の調製

使い捨てプラスチック製ために、約3×8インチ深さ(ミクロ希沢器の尖端の全浸漬に対して十分)まで無菌蒸留水を充たす。

ミクロ希沢器の組合せを希沢器から取出し、この水に短時間浸漬し、吸収紙にくつつけ、次に各ミクロ希沢器をブンゼンバーナーの焰中で十分焼く。次に加熱したミクロ希沢器を再び水に浸し、吸収紙にくつつけ、希沢器中に再置する。

平版毎にミクロ希沢器の組合せを取り出し、吸収紙にくつけて残留ウイルス懸濁液を除

れるように、力値はリード・ミニュンヒまたはカルバーの計算によつて計算される一略述すると、陰性を下向きに加え、陽性を上向きに加え、試料計算中示されるとおり各希沢水準において陽性の百分率を計算する。

#### I. 血清中和抗体検定

##### A. 検定子板の封裹

無菌組織培養平板、転移平板およびふたをそれらの包みから取出し、組織培養平板中所定の場所に転移平板と組立て、両者をふたで覆う。平板に、使用される細胞、検定が開始される日付および個々の同定番号の印をふたおよび組織培養平板上に共につける。各試料に対して検定シートを準備する。

##### B. 試料の調製

検定すべき血清を5.6℃において30分間不活性化させ、使用前室温に冷却する。

##### C. ピペッターの封裹

使い捨てプラスチック製ために自動ピペットの基部の所定の空間に入れる、ユニット

き、次に水リーンスに浸漬し次に吸収する(更に2回吸収と吸収のサイクルをくり返す)。脊柱の平板毎に、ミクロ希沢器の組合せを取り出し吸収紙にくつつけ、水に浸漬し、吸取り、上述したとおり焰で焼き浸漬し吸収する。同じ操作を、その日の検定のおりに使用する。

##### E. 試料の力値測定

転移平板を組織培養平板、転移平板およびふたの組合せから取出し、転移平板ホルダーに入れ(ふたは、組織培養平板の最上部に置きおえる)。転移平板ホルダーを自動ピペット中に置き、希沢剤0.025ml(1滴)を96個の凹みの谷々に添加する。次に転移平板ホルダーをピペットから取出す。試供される試料(血清)の1滴(0.025ml)を、転移平板の列A中2個の接した凹みの谷々に無菌ピペットを使用して注意して添加し、試取される5種の他の血清に対しても同様にする。次に転移平板ホルダーを自動希沢器中に置き、7回の1:2希釈を行なう。次

に転移平板ホルダーを自動希沢器から取出し、自動ピペット中に置き、そのためを次第ウイルス懸濁液で充たす。次に転移平板の各凹みに攻撃ウイルス懸濁液1滴(0.025ml)を添加する。次に希釈された血清試料-ウイルス混合物を転移平板ホルダーから取出し、組織培養平板に入れ、ふたで覆い、36±1℃、5%CO<sub>2</sub>、95%RHにおいて1時間培養する。培養期間の終りに、転移平板を転移平板ホルダーに入れ、ふたで覆う。組織培養平板を、ためが適当な組織培養懸濁液(典型的には当たり160,000個のVERO細胞)で充たされている自動ピペット中に入れる。組織培養平板中の凹みの谷々に対して、この細胞懸濁液0.075ml(3滴)を添加する。組織培養平板をピペットから取出し、転移平板をそれの中に入れ、次に引き上げて転移平板中のウイルス希釈物の組織培養平板中の細胞懸濁液への転移を行なわせる。転移平板を放棄し(オートクレーブ処理するため)、

出せらるく比較的毒性な染料の使用によって洗浄をなくすことができる。平板を紙タオルで乾燥し、そのふたで覆う。

#### 6. 試験處理

試験される血清が力価測定に使用される場合において毒性があるかどうか確かめるために、当研究室で攻撃ウイルスを置換する以外すべてのことが同じである他の1平板を調製する。

#### II. ウィルス力価測定

この操作中使用する攻撃ウイルスを、バイラル・アッセイ・プロシージュア中記載されているとおり同時に検定する。血清中和検定半定量される精緻に拘しては、ウィルスは、 $0.025 \text{ ml 当り } 2.0 \sim 5.0 \text{ TCID}_{50}$  を含むする。

以下の実験例は本発明を示すが、それを模倣しない限り、基盤はすべて該氏度で表わされる。

#### 6. 1.

##### A. 調製培養

ウサギ脛骨膜細胞系を、EMEM(イーグルの最小必須培地) + 1.0% V/V 胎児コウシ血清(熱不活性化せず) + 1.0% V/V のL-グルタミンの2.0% ミリー・モル溶液 + 0.05% のネオマイシンの1.0% mg/ml 溶液(L-グルタミンは使用直前添加する)中、相当り200,000個の細胞培養で検定に使用される日に調製する。試料当り約8mlの細胞懸濁液を要する。使用するまで細胞を攪拌する。

##### B. 培地

希釈用培地 - EMEM + 2.0% V/V 胎児コウシ血清(熱不活性化せず) + 0.05% V/V のネオマイシンの1.0% mg/ml 溶液 + 1.0% V/V のL-グルタミンの2.0% ミリー・モル溶液(L-グルタミンは使用直前添加する)。

##### C. カルボールフクシン染料、濃厚

1.0% のフクシン原液(9.5% の酢9.5% エタノール中1.0% の酸性フクシンを1.5分間搅拌)

7.0 ml のエタノール、9.5%

3.20 ml のフニノール、水中 5 g

##### D. ウィルス試料

1. 試験まで標物試料を -7.0°C に貯蔵する。

2. 試験まで標物乾燥試料を 2 ~ 5°C に貯蔵する。

3. ハウス・レフアレンス・スタンダードウィルス懸濁液の凍結保存標本を、試験まで -7.0°C に貯蔵する。各検定の場合、部分標本を試験する。

前の詳細な説明中示されているとおり、検定平板、ビベッターおよび希釈器を調製する。底層ウイルスの試料は、凍結であつても凍結乾燥であつても、発明の詳細な説明のセクションB中示されているとおり調製される。次に検定平板の列A中の皿に試料を添加し、詳細な説明のセクションE中のとおり試料を力価測定し、培養そして染色する。培養は $3.2^{\pm}1$ 、 $5\%$  CO<sub>2</sub>、 $9.5$  RHにおいて1.0日間実施する。染色は、酸カルボールフクシ

ン染料を使用して行なう。

次に蛍光箱に置くことによって平板を読み取り、感染した凹みを陽性(+)、感染しない凹みを陰性(-)と評点する。検定シートは次のとおりである。

試料	試験											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
F	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
G	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

次の計算シートを使用しリード-ミニュンヒまたはカルバーの技術を使用して試料の力値を計算する。

1 他の細胞の濃度で検定中使用するべき日に調製する。平板当り約8mlの細胞懸濁液を要す。使用まで細胞を攪拌する。

#### B. 培地

培地 199 + リットル当り20mlのガンマコウシ血清(不活性化) + リットル当り8.3mlの2.8% NaHCO<sub>3</sub> + 0.05% V/Vのネオマイシンの100mg/ml溶液。

#### C. カルボールフクシン染料、希薄

10 mg/mlのフクシン原液

17.5mlのエタノール、95%

8.00mlのフェノール、水中5%

#### D. 血清試料

試料はすべて使用前不活性化(56°、30分)させる。

#### E. 攻撃ウイルス

使用直前処理用培地で1:20希釈したMSDおたふくかぜハウス・スタンダード3号。

#### F. 操作

試料の $\log_{10}$ 希釈	P/N	N			P	NP
		0	20	100	50	
A	0.6	12/0				
B	1.2	12/0				
C	1.8	12/0				
D	2.4	12/0	0	20	100	
E	3.0	4/8	8	8	50	
F	3.6	3/9	17	4	19	
G	4.2	1/11	28	1	3	
H	4.8	0/12	40	0	0	

この試料の力値は 0.025 ml 当り 3.0  $\log_{10}$  である。

#### 例 2.

#### おたふくかぜ血清 - 中和抗体の決定

##### A. 細胞培養

Vero(尾長ザル腎連続細胞系)細胞懸濁液を、培地 199 + 1.0% V/V 胎児コウシ血清(不活性化せず) + 0.05% V/V のネオマイシンの 100mg/ml 溶液中当り 160,000

前の詳細な説明を示されているとおり、検定平板、ピベッターおよび希釈器を調製する。移動平板ホルダー中に保持した転移平板をペレッター中に置き、96個の凹みの各々に希釈用培地 1 滴 (0.025ml) を添加する。転移平板の列 A 中 2 個の並接する凹みの各々に試験される血清 1 滴 (0.025ml) を添加し、試験される 5 種の他の血清に対しても同様にする。次に転移平板を自動希釈器中に置き、操作するととき、試験される血清の 7 回の連続 1 : 2 希釈を行なう。次にホルダー中の転移平板をピベッター中に再置し(この直前に、使い捨てために攻撃ウイルスの懸濁液を充たす)。各凹みに攻撃ウイルス 1 滴を添加する。次に転移平板を細胞培養平板に入れ、ふたで覆い、培養器 (36 ± 1°, 5% CO<sub>2</sub>, 95% RH) 中に 1 時間保つ。この期間の終りに転移平板を立ててユニットから取出し、転移平板ホルダーに入れ、ふたで覆う。このユニットの細胞培養平板を自動ピベッター中に置

和検定中使用される希釈液に対してはウイルスは 0.0~2.5 希釈液より 2.0~5.0 TCID<sub>50</sub> を含有する。

## (4) 検定シート

	血清1	血清2	血清3	血清4	血清5	血清6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## 結果の計算

	希釈	血清1	血清2	血清3	血清4	血清5	血清6
A	1:8	2/0	3/2	2/0	0.2	2/0	0/2
B	1:4	2/0	0.2	2/0	0.2	2/0	0/2
C	1:5	2/0	0.2	2/0	0.2	2/0	0.2
D	1:16	2/0	0.2	2/0	0.2	2/0	2.0

E 1:32 2/0 2/0 2/0 0.2 2/0 2/0  
 F 1:64 2/0 2/0 2/0 0.2 2/0 2/0  
 G 1:128 2/0 2/0 2.0 2/0 2/0 2/0  
 H 1:256 2/0 2/0 2/0 2/0 2/0 2/0  
 力値 <1:2 1:16 1:2 1:64 <1:2 1:8  
 力値 <1:2 1:16 1:2 1:64 <1:2 1:8

## 例 3.

例 1 の操作に従つて 192 種の血清を含むヘルペスウイルス中和検定を実施した。含まれる全時間は 2 人日であつた。この試験は、48 回の自動 - CPE 平板および約 500 枚の試験を要した。標準プラク検定 (PFU) によつて同じ試験を実施すれば 20 人日の仕事を要し、2,000 枚の CPE 平板および約 2,500 枚の試験を要したであらう。

(3) 委任状及証明文 各 1 通

(4) 要求権主張証明書及証明文 各 1 通

## 7. 前記以外の発明者及代理人

## (1) 発明者の住所・氏名

アメリカ合衆国、ペンシルベニア州 19004.  
 アンプラー、マリエッタ ドライヴ 717

イリアム ジー、マクアレー

アメリカ合衆国、ペンシルベニア州 19038.  
 ノース ウエールズ、サンディーズ レーン 1408

イリアム ジー、ミラー

## (2) 代理人の住所・氏名

〒100  
 東京都千代田区丸の内3-2-3 富士ビル510号室  
 電話(213) 1561 ~ 1565

(6655) 井理士 安 井 幸 一

同 上

(6459) 井理士 井 林 貴